

Scrambling of membrane phospholipids in platelets and erythrocytes

Citation for published version (APA):

Smeets, E. F. (1996). Scrambling of membrane phospholipids in platelets and erythrocytes. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1996

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The mammalian plasma membrane shows an asymmetric phospholipid distribution: the choline containing phospholipids phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (Sph) are concentrated in the outer leaflet, whereas the aminophospholipids phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE) are mainly confined to the inner leaflet. The role of plasma membrane phospholipid asymmetry in physiology can be illustrated by the processes that are accelerated once PS becomes exposed at the cell's surface, as the result of cellular activation.

From its discovery, first in erythrocytes some 25 years ago, important parts of the concept of phospholipid asymmetry have been unraveled. Nowadays, the essential role for the aminophospholipid translocase in establishing the asymmetry with respect to the aminophospholipids has been widely accepted. On the other hand, though, the loss of phospholipid asymmetry that may occur during cellular activation, forms a topic which largely remained unclarified.

In the work presented in this thesis, the mechanisms responsible for the maintenance and the loss of phospholipid asymmetry in the plasma membrane of blood cells were addressed.

Chapter 1 summarizes the present knowledge on plasma membrane phospholipid asymmetry and gives an introduction to the methods of investigation employed throughout this thesis.

The phenomenon of activation-induced transbilayer movement of phospholipids, or 'scrambling' is introduced. In some experiments aimed at clarifying the mechanisms involved in lipid scrambling, we were able to employ Scott Syndrome blood cells. This syndrome is characterized by a moderately severe bleeding disorder resulting from an unpaired capacity of the patient's platelets and other blood cells to scramble their plasma membrane phospholipids upon activation. Among the physiological implications related to loss of phospholipid asymmetry - of which exposure of PS is often considered to be the most important consequence - are blood coagulation, cellular recognition and apoptosis. Most evident is the role of PS exposure in the process of blood coagulation, where it results in creation of binding sites for enzyme complexes on the surface of the membranes of the cells involved, in this way exerting site-restricted control. In addition, PS exposure is thought to be critically involved in the removal of apoptotic cells. At the end of Chapter 1 the outline of this thesis is given.

Because the activity of the prothrombinase complex (factor Xa, Va, fosfolipid plus Ca^{2+}) is dependent on the presence of PS, this reaction can be used to monitor PS exposure on cells *in vitro*, as an indication for the loss of lipid asymmetry. As a further validation of this method, phospholipid vesicles with a well defined composition served as a model in which the potential contribution of other phospholipid classes and cholesterol to the prothrombinase activity could be investigated. Incorporation of PE in vesicles composed of the 'inert carrier lipid' PC plus small amounts of PS, resulted in a clearly higher sensitivity of the

prothrombinase assay (Chapter 2), regardless of the presence of cholesterol. Incorporation of Sph, on the other hand, led to lower sensitivities. The results provide a further support for the prothrombinase assay as a valuable method to detect very low amounts of surface PS in phospholipid vesicles and in cell suspensions alike, but imply that possible changes in distribution of PE and Sph should be addressed as well. In Chapter 3 we studied the influence of the chirality of the serine moiety of PS on its prothrombinase supporting (i.e. factor Xa- and Va-binding) capacities. Higher binding affinities (low K_d values) for both factor Va and Xa were found with the physiologically occurring phosphatidyl-L-serine (PLS) than with phosphatidyl-D-serine (PDS). This difference in binding affinity applied principally to factor Va, and was further illustrated by the fact that the activity (i.e. binding) of the prothrombinase complex to PDS-containing membranes could be inhibited by changing the surface charge of the membrane, whereas this change hardly affected prothrombinase activity of PLS-containing membranes. Phosphatidyl-lactate (a phospholipid resembling PS but lacking the amino group) behaved similar to PDS. Taken together, these data illustrate the unique procoagulant activity exerted by the naturally occurring PLS in biological membranes.

Activation-induced scrambling of phospholipids in blood platelets and erythrocytes is a phenomenon that requires an influx of Ca^{2+} -ions from the extracellular environment. To investigate to what extent a given elevated concentration of intracellular Ca^{2+} -ions ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is related to the loss of asymmetry in blood platelets, the studies described in Chapter 4 were carried out. As described previously, thrombin (factor IIa) has only a very moderate effect on the procoagulant response of blood platelets, whereas other activation-related phenomena, such as shape change, secretion and aggregation are readily induced by this protease. An inhibitor of an intracellular Ca^{2+} -pump, thapsigargin, added alone or in combination with thrombin, was used to vary the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in platelets while at the same time the procoagulant response and the shedding of microvesicles from the plasma membrane was monitored. Elevated levels of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were not always accompanied by elevated prothrombinase activities. We therefore concluded that determining the level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is unsuitable for predicting the accompanying level of lipid scrambling or that of microvesicle formation. Experiments in which platelets were pretreated with thapsigargin and subsequently activated with thrombin, revealed that these agonists work in a synergistic way to induce lipid scrambling.

Conflicting reports in the literature regarding the identity of the phospholipid classes that are subject to Ca^{2+} -induced scrambling, led us to carry out the experiments reported in Chapter 5. Transbilayer movements of fluorescently labeled phospholipids (NBD-PC, NBD-PLS, NBD-PDS, and NBD-Sph) were studied in blood platelets and erythrocytes. In both cell types, aminophospholipid translocase showed a slightly higher activity towards NBD-PLS, as compared to the D-isomer. However, scramblase activity in both cell types showed no definite preference for any of the different types of NBD-phospholipids, an exception being the (outer

to inner leaflet) movement of NBD-Sph which was somewhat slower than that of the other lipids tested. The lower level of NBD-Sph movement was most evident during the initial stages of phospholipid scrambling. On the basis of this lower velocity of NBD-Sph movement, we hypothesized that imbalances in lipid mass between inner and outer leaflet may occur, in its turn facilitating the formation of microvesicles.

Since the 'BSA back-exchange' method does not allow short-term evaluation of transbilayer movements of NBD-labeled phospholipids (NBD-PL), a method to analyze transbilayer movement of NBD-PL in blood platelets in a *continuous* manner was developed (Chapter 6). The key to this assay is the dithionite-ion, which is capable of reducing the nitro moiety of the NBD group into an amino moiety, hereby abolishing NBD-fluorescence. When present in a platelet suspension loaded with NBD-PL, the relatively membrane impermeable dithionite instantaneously reduces each NBD-PL present or appearing in the outer leaflet, thus offering an estimate of inner to outer movement of NBD-PL, provided that fluorescence is measured at small time intervals. The assay confirmed that the appearance of NBD-PS at the platelet's surface after appropriate activation is a rapid process indeed (virtually all of the inner leaflet NBD-PS becomes exposed within 90 s). Furthermore, using this assay we demonstrated that lipid scrambling is reversible, bidirectional and insensitive to the lipid headgroup. Moreover, since the scrambling process appeared to be inhibited by the sulphhydryl reagent pyridyldithioethylamine (PDA), a suggestion as to the protein nature of the scrambling entity was obtained.

The experiments presented in Chapter 7 were carried out to check whether the complex of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) with Ca²⁺-ions could be directly responsible for lipid scrambling in erythrocytes upon treatment with Ca²⁺/ionophore, as had been recently reported in the literature. Our experiments disaffirmed this concept.

More evidence for the protein nature of scramblase activity is presented in Chapter 8. Using anion exchange column chromatography to separate cholate-solubilized platelet plasma membrane proteins, followed by detergent dialysis to reconstitute proteins of individual fractions into phospholipid vesicles supplemented with trace amounts of NBD-PL, we were able to assign phospholipid scrambling activity to a distinct protein fraction. Treatment of the active protein fractions with pronase or PDA, or exposure to heat, followed by reconstitution led to lower scrambling activity. From these results we argued that a membrane protein (or proteins) from blood platelets is required for the loss of asymmetry that may occur as a result of platelet activation. Improvement and extension of studies using this protocol on various blood cells, including those from patients suffering from Scott syndrome, combined with the availability of (genetic) data on these patients may form the basis for identification of components responsible for the mechanism that we termed scramblase.

Samenvatting

De plasmamembraan van zoogdiercellen vertoont een asymmetrische verdeling van de fosfolipiden: de choline-bevattende fosfolipiden phosphatidylcholine (PC) en sphingomyeline (Sph) bevinden zich voornamelijk in de buitenste monolaag (leaflet), terwijl de aminofosfolipiden phosphatidylserine (PS) en phosphatidylethanolamine (PE) zich daarentegen voornamelijk in de binnenste leaflet bevinden. De fysiologische rol van deze asymmetrische plasma membraan fosfolipiden verdeling kan geïllustreerd worden aan de hand van de processen welke aanmerkelijk worden versneld indien PS tot expressie komt aan de oppervlak van de celmembraan als gevolg van cel-activatie.

Belangrijke aspecten bij het begrip fosfolipiden asymmetrie zijn sinds het eerste moment van ontdekking, ongeveer 25 jaar geleden in rode bloedcellen, bekend geworden. Tegenwoordig wordt de onmisbare rol van de aminofosfolipiden translocase in het creëren van de asymmetrie met betrekking tot aminofosfolipiden alom aanvaard. Echter, het verlies aan fosfolipiden asymmetrie dat kan optreden gedurende cel-activatie, vormt hierbinnen een gebied dat nog grotendeels onbekend is gebleven.

De studies die beschreven staan in dit proefschrift pogen nadere aspecten aan het licht te brengen omtrent de mechanismen verantwoordelijk voor het behoud- en het verlies van fosfolipiden asymmetrie in de plasma membraan van bloedcellen.

In Hoofdstuk 1 wordt enerzijds een samenvatting gegeven van de huidige kennis over plasma membraan fosfolipiden asymmetrie, anderzijds worden de experimentele methoden en technieken geïntroduceerd, zoals die zijn gebruikt in de individuele studies van dit proefschrift. Transbilaag beweging van fosfolipiden, welke optreedt als gevolg van cel-activatie en ook wel 'scrambling' wordt genoemd, wordt beschreven. In enkele experimenten gericht op het verduidelijken van de mechanismen betrokken bij lipiden scrambling hebben we gebruik kunnen maken van cellen van een patiënt lijdend aan Scott syndroom. Dit syndroom wordt gekenmerkt door een matig ernstige bloedingsneiging veroorzaakt door de verminderde capaciteit van de bloedplaatjes en andere bloedcellen om hun plasma membraan fosfolipiden te scramblen wanneer ze worden geactiveerd. Bloedstolling, cellulaire herkenning en apoptosis behoren tot de fysiologische implicaties van verlies aan fosfolipiden asymmetrie, waarbij de expressie van PS vaak het meest opmerkelijk is. Overduidelijk is de rol die expositie van PS speelt bij de bloedstolling, waardoor bindingsplaatsen op de betrokken cel-oppervlakken ontstaan ten behoeve de assemblage van enzym complexen. Hierdoor wordt een plaats-gebonden controle van het hemostase proces gewaarborgd. Aan het einde van Hoofdstuk 1 wordt het verdere overzicht van het proefschrift gegeven.

Omdat de activiteit van het prothrombinase enzym complex (stolfactor Xa en Va, fosfolipiden en Ca^{2+}) in hoge mate afhankelijk is van de aanwezigheid van PS, kan deze activiteit gebruikt worden om bij cellen *in vitro* PS expositie te detecteren. Deze test kan daardoor dienen als

schatting van een verlies aan lipiden asymmetrie. Als verdere validering voor deze test-methode werden fosfolipiden vesicles met een goed gekarakteriseerde samenstelling als model gebruikt, met als doel om de mogelijke bijdragen van andere fosfolipiden klassen (andere dan PS) aan de gemeten prothrombinase activiteit vast te stellen. Het bijvoegen van PE aan vesicles samengesteld uit het inerte carrier lipide PC en kleine hoeveelheden PS resulteerde in een duidelijk hogere gevoeligheid van de prothrombinase test (Hoofdstuk 2). Dit effect trad op ongeacht de aanwezigheid van cholesterol. Het toevoegen van Sph, echter, leidde tot een lagere gevoeligheid. De resultaten betekenen een verdere steun voor de prothrombinase test als waardevolle methode om lage concentraties PS te detecteren in zowel fosfolipiden vesicles als in suspensies van cellen, maar houden tevens in dat mogelijke veranderingen in transbilaag verdeling van PE en Sph in acht moeten worden genomen. In Hoofdstuk 3 bestudeerden we de invloed van de chiraliteit van het serine-deel van PS op zijn prothrombinase ondersteunende (factor Xa en Va bindende) capaciteit. Voor het fysiologisch voorkomende phosphatidyl-L-serine (PLS) werden hogere bindingsaffiniteiten (lage K_d waarden) gevonden dan voor phosphatidyl-D-serine (PDS). Dit verschil in bindings affiniteit had vooral betrekking op factor Va, en kon verder geïllustreerd worden door het feit dat de activiteit (binden) van het prothrombinase complex op PDS-bevattende membranen geremd kon worden door verandering van de lading van het oppervlak. Dit effect trad nauwelijks op bij binding aan PLS-bevattende membranen. Phosphatidyl-lactaat (een fosfolipide dat lijkt op PS maar dat de aminogroep mist) gedroeg zich gelijk aan PDS. Samenvattend, illustreren onze gegevens het unieke bloedstollings-bevorderende gedrag van het fysiologische PLS, aanwezig in biologische membranen.

Het activatie-geïnduceerde scramblen van fosfolipiden in bloedplaatjes en rode bloedcellen is een verschijnsel dat een influx van Ca^{2+} -ionen vanuit het extracellulaire milieu vereist. De studies beschreven in Hoofdstuk 4 werden uitgevoerd om te zien in hoeverre een gegeven verhoging van de intracellulaire Ca^{2+} concentratie ($[Ca^{2+}]_i$) gerelateerd kan worden aan het verlies van fosfolipiden asymmetrie. Reeds eerder werd beschreven dat thrombine (factor IIa) een tamelijk klein effect heeft op de bloedstollings-bevorderende capaciteiten van bloedplaatjes, hoewel andere activatie verschijnselen, zoals vormverandering, secretie en aggregatie zeer gemakkelijk worden geïnduceerd door dit eiwit splitsend enzym. Een remmer van een intracellulaire Ca^{2+} -pomp, genaamd thapsigargine, hetzij alleen, hetzij in combinatie met thrombine, werd gebruikt om veranderingen in $[Ca^{2+}]_i$ te bewerkstelligen. Tegelijkertijd werden de bloedstollings-bevorderende activiteit gemeten van de bloedplaatjes en de mate waarin zij microvesicles van hun plasma membraan afsnoeren. Gestegen $[Ca^{2+}]_i$ waarden werden niet altijd vergezeld door gestegen prothrombinase activiteiten. We concludeerden dan ook dat de bepaling van één $[Ca^{2+}]_i$ waarde niet geschikt is om het bijbehorend verlies aan fosfolipiden asymmetrie of het aantal afgesnoerde microvesicles te voorspellen. Experimenten waarbij bloedplaatjes, na een voorbehandeling met thapsigargine, werden geactiveerd met

thrombine wezen uit dat deze twee agonisten synergistisch werkten op het scramblen van lipiden.

Het bestaan van tegenstellingen in de literatuur, daar waar het betreft welke klassen fosfolipiden participeren in het proces van Ca^{2+} -geïnduceerde scrambling, heeft ons de experimenten in Hoofdstuk 5 doen uitvoeren. De transbilaag bewegingen van fosfolipiden moleculen gemerkt met een fluorescente groep (NBD-PC, NBD-PLS, NBD-PDS en NBD-Sph) werden bestudeerd in bloedplaatjes en rode bloedcellen. In beide celtypen vertoonde de aminophospholipid translocase een grotere activiteit voor NBD-PLS dan voor de D-isovorm. Scramblase activiteit daarentegen, vertoonde geen definitieve voorkeur voor één van de verschillende NBD-fosfolipiden, hoewel er hierop een uitzondering bestond: de (inwaartse) beweging van NBD-Sph was een weinig trager dan dat van de andere geteste lipiden. Deze lagere snelheid van NBD-Sph beweging was het duidelijkst waarneembaar tijdens de beginfasen van fosfolipiden scrambling en vormde de basis van de door ons geponeerde stelling dat hierdoor een verschil tussen binnen- en buitenste leaflet kan optreden, voor wat betreft lipiden massa's, hetgeen op zijn beurt het afsnoeren van microvesicles zou kunnen vergemakkelijken.

Omdat de 'BSA back-exchange' methode geen korte termijn bepalingen van transbilaag bewegingen van NBD-fosfolipiden (NBD-PL) toestaat, werd een methode ontwikkeld om de transbilaag beweging van NBD-PL in bloedplaatjes op een continue manier te meten (Hoofdstuk 6). De testmethode berust op het dithionite ion. Dit ion is in staat om de nitro-groep van het NBD label te reduceren tot een amino-groep en hierdoor gaat de NBD-fluorescentie verloren. Het relatief membraan ondoorlaatbare ion reduceert, na toevoeging aan een tevoren met NBD-PL geïncubeerde suspensie van bloedplaatjes, onmiddellijk het aanwezige NBD-PL in de buitenste leaflet, of het hierin tevoorschijn komende NBD-PL. Op voorwaarde dat de fluorescentie gemeten wordt met (voldoende kleine) tussenpozen, kan de assay een schatting van de snelheid van uitwaartse beweging van NBD-PL opleveren. Resultaten van de tests bevestigden dat de expositie van NBD-PS aan het oppervlak van geactiveerde bloedplaatjes inderdaad een snel proces is (vrijwel al het NBD-PS dat zich in de binnenste leaflet bevindt, wordt geëxposeerd binnen 90 seconden). Gebruikmakend van deze methode, konden we voorts laten zien dat lipiden scrambling omkeerbaar is, in twee richtingen werkt en niet gevoelig is voor de soort kop-groep van het fosfolipid. Bovendien verkregen we een eerste aanwijzing dat mogelijk een eiwit betrokken is bij lipiden scrambling, omdat het SH-reagens pyridyldithioethylamine (PDA) de lipiden scrambling bleek te remmen.

Recentelijk werd in de literatuur gerapporteerd dat het complex van phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) met Ca^{2+} -ionen direct verantwoordelijk was voor lipiden scrambling in rode bloedcellen, na behandeling met Ca^{2+} /ionofoor. Uitgevoerd met als doel deze

hypothese te testen, wezen onze experimenten uit dat dit complex *alleen* niet verantwoordelijk kan zijn voor lipiden scrambling (Hoofdstuk 7).

Hoofdstuk 8 voegt bewijs toe aan de hypothese dat lipiden scrambling gereguleerd wordt door een eiwit. We gebruikten kolommen met anionen wisselaars om bloedplaatjes membraaneiwwitten, tevoren opgelost in cholaat, in fracties te scheiden. Reconstitutie van eiwwitten uit de verschillende fracties in lipiden vesicles met hierin tevens kleine hoeveelheden NBD-PL werd gerealiseerd door het detergens te verwijderen door middel van dialyse. De hieruit voortkomende set experimenten stelde ons in staat om lipiden scrambling activiteit aan één bepaalde eiwit-fractie toe te schrijven. Behandeling van deze actieve fractie met pronase of met PDA, of het blootstellen aan hitte, leidde - na reconstitutie - tot een afgenomen lipiden scrambling activiteit. We beredeneerden, gezien deze resultaten, dat de aanwezigheid van een (of meerdere) bloedplaatjes membraaneiwit(ten) vereist is voor verlies van fosfolipiden asymmetrie dat op kan treden na bloedplaatjes activatie. Verbeteringen van dit protocol enerzijds en uitbreidingen naar andere celtypen, waaronder bloedcellen van patienten met Scott syndroom anderzijds, zouden - samen met het beschikbaar komen van (genetische) gegevens van deze patiënten - een basis kunnen vormen voor de identificatie van de componenten die verantwoordelijk zijn voor het mechanisme dat we scramblase hebben genoemd.